

## 生殖細胞の分化, 増殖を制御する分子機構の解析

著者	澤 雅弘
号	1285
発行年	1996
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/21231">http://hdl.handle.net/10097/21231</a>

氏 名（本籍）	やなぎ 栢	さわ 澤	まさ 雅	ひろ 弘
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）			
学 位 記 番 号	医 博 第 1 2 8 5 号			
学位授与年月日	平 成 8 年 3 月 26 日			
学位授与の条件	学位規則第4条第1項該当			
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）病理学系専攻			
学 位 論 文 題 目	生殖細胞の分化，増殖を制御する分子機構の解析			

（主 査）

論文審査委員	教授 帯 刀 益 夫	教授 田 村 眞 理
	教授 矢 嶋 聰	

## 論 文 内 容 要 旨

生殖系列の細胞の分化の分子機構については殆ど分かっていないため、生殖細胞の分化、増殖を制御する因子の解析を試みることにした。生殖細胞においてこれまでに知られている分化、増殖に関与する因子は極僅かであるがそれらは全てレセプター型プロテインキナーゼ又はそのリガンドである。そこで1) 生殖細胞の分化、増殖に必要な因子を特にプロテインキナーゼに注目し生殖細胞で発現する新しいプロテインキナーゼ遺伝子を同定し、その機能を調べる。2) マウス始原生殖細胞は、受精後 13.5 日以降増殖を停止するがこの機構を解明するため、丁度この時期に発現が低下する *c-kit* に注目し *c-kit* を過剰発現した始原生殖細胞を作成し、増殖に対する影響を調べる。この 2 点を研究目的とした。

(1-1) EG 細胞（始原生殖細胞の細胞株）で発現するプロテインキナーゼ遺伝子のクローニング  
プロテインキナーゼに保存されている配列を PCR プライマーとして選び、EG 細胞（始原生殖細胞の細胞株）から抽出した total RNA に対して RT-PCR を行い、できた PCR 産物を任意に 74 個抽出し、構造を決定した。その結果、セリン/スレオニンキナーゼをコードする新しい遺伝子が 2 種類得られた。それぞれ *GCK1*, *GCK2* (Germ Cell Kinase) と名づけた。*GCK1*, *GCK2* はともに RNA ブロット解析により確かに精巣、卵巣での発現がみられたのでさらに詳しく調べることにした。

### (1-2) *GCK1* の構造と発現

PCR 産物をプローブとしてマウス脾臓 cDNA ライブラリーをスクリーニングしそれをもとにまず構造を決定した。*GCK1* は 966 アミノ酸をコードしていた。又、RNA ブロット解析により性腺で発現がみられる以外に EG 細胞、脾臓、胸腺、胎仔肝などで発現がみられた。次に、*GCK1* の生殖細胞における発現を調べるために、マウス胎仔の生殖隆起と成熟マウスの性腺で *in situ* hybridization を行った。その結果、*GCK1* は始原生殖細胞で発現していることが分かった。さらに成熟マウスの精巣では減数分裂前後の生殖細胞に特異的に発現していることが分かった。卵巣では限局したシグナルはみられなかった。RNA ブロット解析の結果と合わせ、卵巣では全ての細胞で弱く発現していると思われた。

### (1-3) *GCK2* の構造と発現

一方 *GCK2* についても、同様にまず最初に構造の決定を行った。*GCK2* は 888 アミノ酸からなり、ロイシンジッパー・モチーフを持っていることが分かった。ハイドロパシープロットの結果より膜貫通部位はないものと思われた。又、RNA ブロット解析により性腺で発現がみられる以外に EG 細胞、腎、脾臓で弱い発現が、脳で強い発現が認められた。次に、*GCK2* の生殖細胞

における発現を調べるために、マウス胎仔の生殖隆起と成熟マウスの性腺で *in situ* hybridization を行った。その結果、*GCK2* は始原生殖細胞で発現していることが分かった。しかし成熟マウスの精巣、卵巣では限局したシグナルは検出できなかった。これは全ての細胞が極弱い発現をしているためと思われる。

#### (1-4) *GCK1*, *GCK2* の染色体マッピング

さらに染色体マッピングを行った結果、*GCK1* は第 11 染色体の *D11Mit205* 及び *D11Mit51* の近傍にあり、*GCK2* は第 15 染色体の *D15Mit16*, *D15Mit35* の近傍にあることが分かった。しかし、これらの領域には生殖細胞の突然変異に関与する遺伝子座は存在していなかった。

#### (2) *c-kit* が始原生殖細胞の増殖に及ぼす影響について

*c-kit* のトランスジェニックマウスについては、始原生殖細胞で特異的に発現させるためマウス *c-kit* cDNA の上流に初期胚全能性細胞と生殖細胞で特異的に発現する *oct-3* 遺伝子のプロモーターをつけ、受精卵に導入し、合計 11 系統のトランスジェニックマウスを得た。このうち、RNA ブロット解析で 2 系統について生殖隆起での外来遺伝子の発現を確認した。正常マウス始原生殖細胞を膜結合型 *SL* 因子を発現するフィーダー細胞上で培養すると生体内で始原生殖細胞が増殖する期間に対応する期間だけ、培養細胞も増殖を続けることが分かっており生体内の始原生殖細胞の増殖を反映している培養法と考えられている。この方法で培養した結果、*c-kit* トランスジェニックマウスは正常マウスと比べ、増殖に関して顕著な差は認められなかった。トランスジェニックマウスでは始原生殖細胞で常に *c-kit* が発現しているにもかかわらず、増殖の停止は起こると考えられる。その為、少なくとも *c-kit* の発現の減少だけでは始原生殖細胞の増殖停止は起こらないことが予想された。

## 審 査 結 果 の 要 旨

生殖系列の細胞は始原生殖細胞から始まり、卵子あるいは精子へと分化するが、生殖系列細胞の増殖と分化の制御がどのような遺伝子により行われているかはまだ不明である。柳沢雅弘は生殖細胞の増殖を制御すると考えられる新しい蛋白キナーゼ遺伝子の同定を行った。このため、まず、始原生殖細胞から由来した全能性の胚性生殖細胞（EG 細胞）を材料として、蛋白キナーゼ遺伝子の進化的に保存された領域をプライマーとして、RT-PCR 法により新しい遺伝子のクローニングを行った。得られた 74 個のクローンから、20 種の蛋白キナーゼ遺伝子が同定され、この中で新規の遺伝子として 2 つのセリン/スレオニンキナーゼ遺伝子をクローン化した。これらの遺伝子は *GCK* (Germ Cell Kinase) 1, *GCK2* と命名し、これらの遺伝子が実際に生殖細胞で働いているかを検討した。まず性腺での発現を確認したのち、*GCK1*, *GCK2* の cDNA をクローニングし、その塩基配列から、これら遺伝子の蛋白構造を明らかにした。*GCK1* は 966 アミノ酸から成るセリン/スレオニンキナーゼで、ショウジョウバエの *NinaC*、酵母の *STE20*, *CDC15* などシグナル伝達や細胞分裂制御に関与している遺伝子と高い相同性が認められた。その発現を詳しく調べると、性腺以外にも脾臓、胸腺、胎児肝や血球などでも発現が認められた。*in situ* hybridization によりマウス胎児の生殖系列での発現を調べたところ、始原生殖細胞、減数分裂前後の精原細胞で限定的な発現が認められた。一方、*GCK2* は、888 アミノ酸から成るセリン/スレオニンキナーゼで、ロイシンジッパーモチーフを持ち、ヒト *MLK1* との相同性が認められた。その発現は始原生殖細胞に限局しており、精巣卵巣での発現は認められなかった。更に、*GCK1* は第 11 染色体上に、*GCK2* は第 15 染色体上にマッピングされた。これらの結果から、新たにクローニングした *GCK1*, *GCK2* は生殖系列細胞で働くセリン/スレオニンキナーゼであることが分かった。また、生殖細胞の増殖制御に関与すると思われる *c-kit* 遺伝子導入トランスジェニックマウスを作出し、始原生殖細胞の *in vitro* の増殖能力に与える効果も検討した。

これら柳沢雅弘の研究成果は生殖生物学、発生生物学に新しい知見を加えたものとして、学位論文に値するものと判定する。